

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de pathologie

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Yusuf KAPANCI

Le rôle de l'actine dans le mouvement ciliaire de l'épithélium trachéo-bronchique

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Nicolas REVERDIN

de

Genève

Thèse No 3490

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de pathologie

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Yusuf KAPANCI

Le rôle de l'actine dans le mouvement ciliaire de l'épithélium trachéo-bronchique

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Nicolas REVERDIN

de

Genève

Thèse No 3490

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Yusuf Kapanci, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 4 mars 1976

Le doyen :
William Geisendorf

Thèse No 3490



Je tiens à remercier le professeur Y. Kapanci qui a suscité l'idée de ce travail et en a dirigé l'élaboration.

Je remercie également le professeur G. Gabbiani de sa collaboration, sans laquelle ce travail n'aurait pu s'effectuer.

La réalisation de cette thèse a bénéficié de la collaboration de Mademoiselle A. Polichouck et de Messieurs E. Denkinger et J.C. Rumbeli. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

En histologie conventionnelle la muqueuse trachéo-bronchique est recouverte d'un épithélium pseudo-stratifié cilié parsemé de cellules caliciformes (1). L'étude de l'ultrastructure de cet épithélium, chez l'homme et le rat, montre qu'il comporte cinq types cellulaires : des cellules basales, intermédiaires, caliciformes, villeuses et ciliées (1, 3). On y trouve également de rares cellules semblables aux cellules endocrines de type APUD, aussi appelées cellules de Kultschitzky (4).

Les cellules ciliées, les plus nombreuses, ont leur surface luminale recouverte d'environ 250 cils régulièrement distribués. L'importance de ces cils réside dans leur participation au nettoyage des voies aériennes. En effet, les voies respiratoires jouent fonctionnellement deux rôles : le premier est le transport d'air, le deuxième est d'assurer la défense du poumon. Ces moyens de défense comprennent schématiquement des liquides de surface, des réserves immunologiques et des ressources épithéliales. Mise à part la filtration due aux turbulences, l'élimination de particules se fait essentiellement grâce au transport muco-ciliaire dépendant de la sécrétion de mucus et du battement ciliaire, c'est-à-dire des ressources épithéliales (5).

Dans ce travail nous avons essayé de mieux comprendre les mécanismes en jeu dans le mouvement ciliaire.

STRUCTURE et MOUVEMENT CILIAIRE

La structure interne du cil comporte 10 paires de microtubules dans une disposition "9 + 2", c'est-à-dire 9 paires de microtubules périphériques entourant deux microtubules centraux (1, 6, 8). Les microtubules de chaque paire périphérique ont été désignés

sous-fibre A ou B selon leur disposition par rapport aux microtubules centraux. Le microtubule le plus interne, la sous-fibre A, est en relation étroite avec la sous-fibre B ou microtubule externe. De plus, la sous-fibre A est porteuse sur toute sa longueur de petits "bras" qui sont apparemment en relation avec la sous-fibre B de la paire voisine. Enfin des liens semblent exister entre les paires périphériques ("nexe") (7) d'une part, et entre les sous-fibres A et les microtubules centraux ("rayons") (8) d'autre part (Fig. 1).

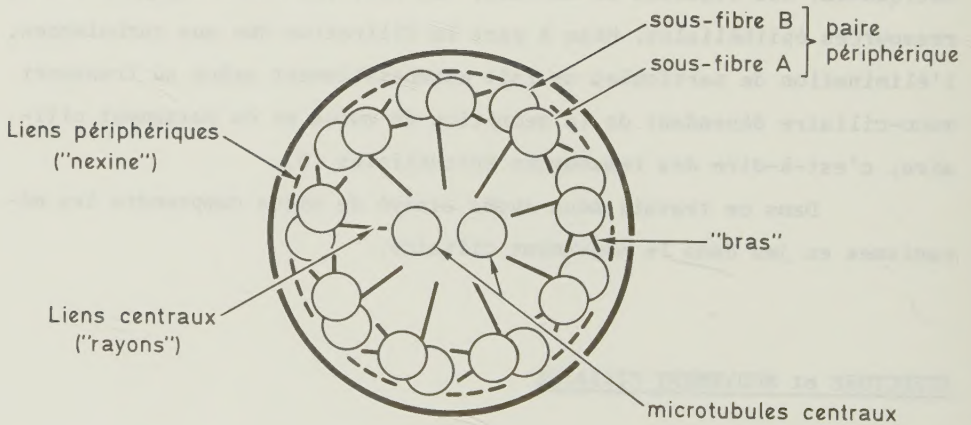


FIGURE 1

Schéma de la structure interne du cil en coupe transversale (modifié d'après B. AFZELIUS (8)).

Le battement ciliaire a pour but de déplacer un liquide. Grâce aux travaux faits sur les cils de protozoaires et de moules, ainsi que sur le flagelle de spermatozoïdes de différentes espèces, le mouvement ciliaire s'explique par la présence des "bras" trouvés sur les sous-fibres A. Ces "bras", extraits de cils de protozoaire, se sont révélés être constitués d'une protéine de structure proche mais non identique à l'actine (9, 10). Cette protéine appelée dynéine, a été démontrée comme ayant une activité ATPase (10, 11), caractère qu'elle partage avec la myosine.

La flexion du cil serait le résultat d'un glissement actif des paires de microtubules périphériques les unes sur les autres, grâce à une interaction entre la dynéine et la sous-fibre B voisine, ce glissement étant du même type que celui de l'actine sur la myosine dans le muscle. Il est à noter que l'on a pu identifier les acides aminés des protéines constituant les microtubules périphériques, et que ceux-ci ressemblent également à l'actine, tout en étant dépourvus de certaines de ses caractéristiques (12). Lors du glissement, la paire centrale servirait de centre de flexion sans lequel le glissement n'aboutirait qu'à l'allongement du cil, ce rôle de centre de flexion étant rendu possible par les "rayons" reliant les deux microfilaments centraux aux paires périphériques (13, 14, 15).

Cette hypothèse permet d'expliquer le battement du cil isolé (16), mais n'apporte pas d'éclaircissement quant à la coordination du mouvement ciliaire et n'exclut pas la participation d'autres mécanismes.

La mise en évidence, dans un nombre croissant de cellules non musculaires, de protéines contarcitiles semblables à l'actine et à la

myosine du muscle lisse et des plaquettes (17), ainsi que leur implication dans diverses activités cellulaires dont la motilité (17, 18), nous ont incité à rechercher la présence d'actine et ses éventuelles relations avec les cils dans l'épithélium trachéo-bronchique de l'homme et du rat.

MATERIEL et METHODE

La trachée de 7 rats (Wistar mâles de 200 à 220 grammes) profondément anesthésiés (17 mg/100 g, Nembutal intrapéritonéal) fut ouverte et canulée. Après provocation d'un pneumothorax bilatéral, 3,5 à 4,5 cc d'une solution de gélatine (10 % dans du NaCl 0,9 % à 38°C) furent injectés dans la trachée à une pression constante de 10 cm H₂O, afin d'éviter une détérioration des cils lors de la coupe au cryostat (19). Après dissection, le bloc trachée-poumon fut plongé dans de l'azote liquide pendant 10 minutes, puis ramené à une température de - 20°C. Des prélèvements furent pratiqués afin d'obtenir des sections longitudinales de la trachée et des bronches souches, puis des coupes sériées furent faites sur un cryostat, 2 coupes consécutives étant montées sur la même lame.

Une des 2 coupes fut ensuite traitée avec du sérum contenant des anti-corps anti-actine (AAA) provenant d'une patiente souffrant d'hépatite chronique agressive, alors que l'autre coupe était traitée avec du sérum normal (20). Les lames furent ensuite passées dans un bain contenant de la fluorescéine couplée à la fraction IgG de sérum de mouton anti-IgG humain. Afin de vérifier la spécificité de la réaction, des coupes successives furent traitées avec du sérum AAA préalablement incubé avec de la thrombasthénine A purifiée (20).

Des échantillons de trachée et de bronches d'un cas d'autopsie (sans maladie pulmonaire) furent prélevés environ une heure post-mortem, congelés au cryostat, coupés et traités comme ci-dessus.

En vue de microscopie électronique, la trachée et les poumons de 5 rats (Wistar mâles de 150 à 200 grammes) furent fixés par perfusion (21), tandis que ceux de 4 rats semblables et d'un cas humain le furent par instillation (19). Du glutaraldéhyde (2 %, tampon phosphate) fut utilisé pour la fixation, la post-fixation étant faite dans de l' OsO_4 (1 %, tampon cacodylate) suivie d'une inclusion dans de l'Epon.

Afin de rechercher la formation de complexes en "fer de lance" (arrow-head) de l'actine avec la méromyosine lourde, des prélèvements frais d'épithélium trachéo-bronchique de rats furent glycerinés puis incubés avec la méromyosine lourde selon la technique d'Ishikawa (22).

RESULTATS

Immunofluorescence

Sur les coupes de trachée et de bronche traitées avec le sérum AAA, tant chez l'homme que chez le rat, on trouve une bande nettement fluorescente, parallèle à la surface épithéliale, juste sous la membrane ciliée (Fig. 2a & c). Sur les coupes témoins traitées avec le sérum normal, ainsi que sur celles traitées avec du sérum AAA incubé avec la thrombasthénine, on ne voit aucune fluorescence (Fig. 2b).

A noter que les cils sont dépourvus de fluorescence et que sur les coupes traitées au sérum AAA, on retrouve une forte fluorescence de la musculature lisse vasculaire et bronchique dans la sous-muqueuse.

Microscopie optique

Le mince ruban sous-ciliaire positif à l'immunofluorescence est fortement éosinophile à la coloration par l'hématoxyline-éosine (Fig. 3).

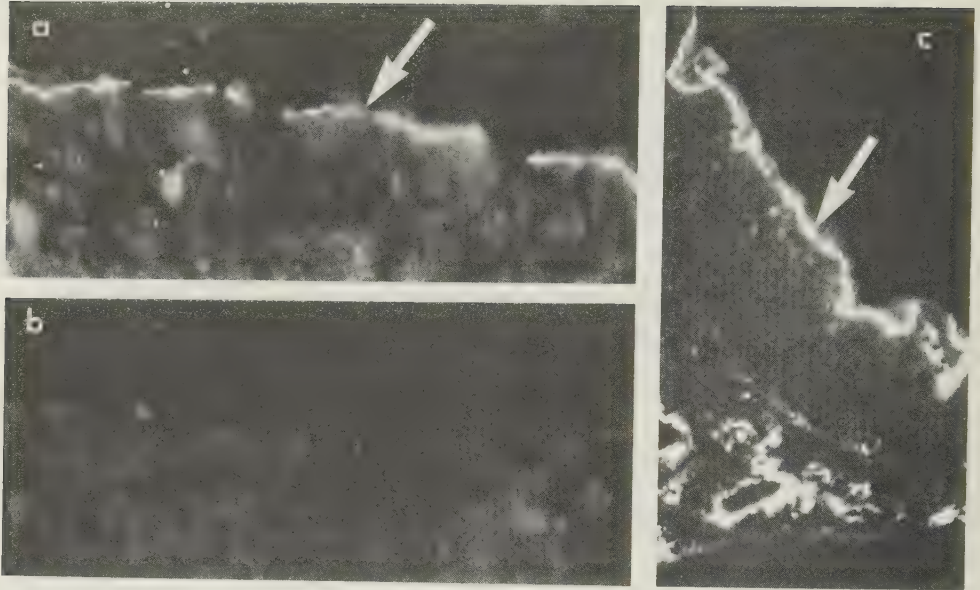


FIGURE 2

- a) Epithélium bronchique humain traité avec du sérum AAA montrant une bande sous-ciliaire (flèche) nettement fluorescente ($\times 800$).
- b) Témoin traité avec du sérum humain normal sans fluorescence ($\times 800$).
- c) Epithélium bronchique de rat traité avec du sérum AAA montrant une bande sous-ciliaire fluorescente (flèche) semblable à a). Noter la fluorescence de la musculature lisse bronchique et vasculaire ($\times 500$).

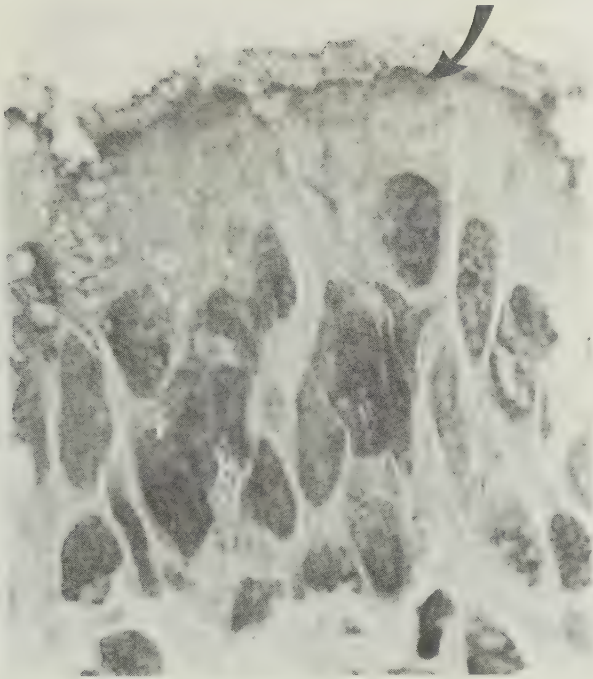


FIGURE 3

Epithélium bronchique de rat montrant le ruban sous-ciliaire fortement éosinophile (flèche) (HE $\times$ 1500).

Microscopie électronique

Les cellules ciliées s'allongent de la membrane basale épithéliale à la lumière respiratoire, traversant donc toute l'épaisseur de l'épithélium. La cellule est occupée par un noyau basal, séparé du cytoplasme apical par une concentration de mitochondries, l'accumulation mitochondriale supranucléaire (Fig. 4).

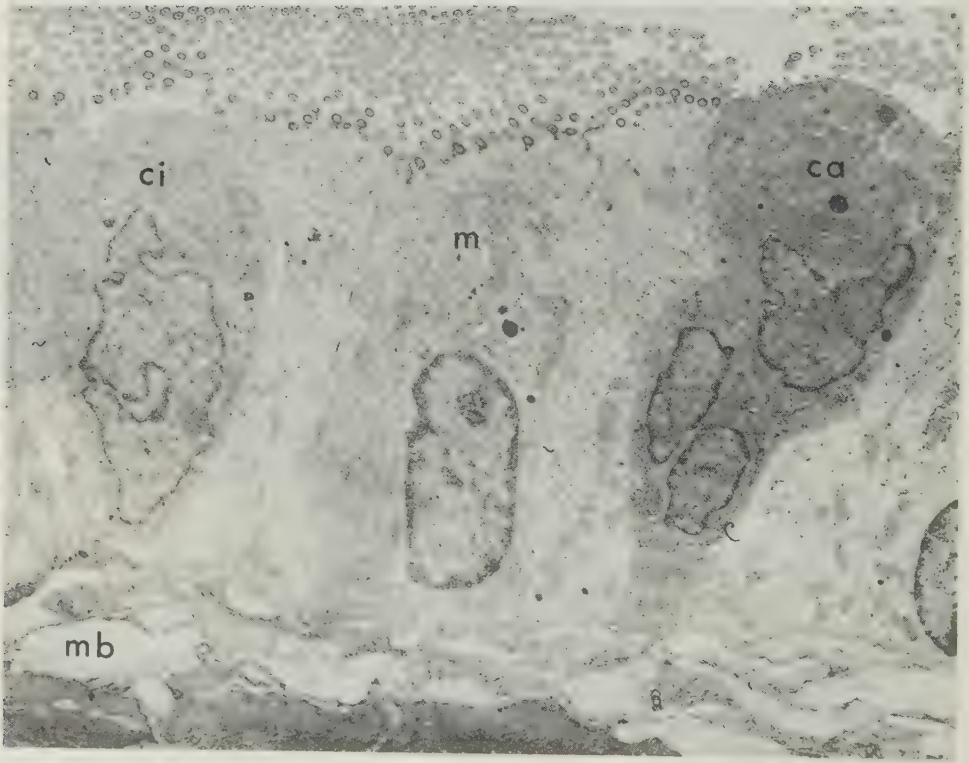


FIGURE 4

Epithélium bronchique composé de cellules ciliées (ci) et de cellules caliciformes (ca) reposant sur la membrane basale (mb). Noter dans le 1/3 supérieur des cellules ciliées l'accumulation mitochondriale supranucléaire (m) et la clarté du cytoplasme apical dans lequel baignent les structures ciliaires basales ($\times 6300$).

L'étude de la zone correspondant à la bande fluorescente montre que les cellules ciliées ont un cytoplasme apical particulier, limité vers le haut par la membrane protoplasmique et vers le bas, à environ 0,5 μ de profondeur, par l'accumulation mitochondriale supranucléaire (Fig. 5). Ce cytoplasme, dépourvu d'organelles habituelles, a un aspect dense et granulaire et contient une trame de microfilaments d'un diamètre de 40-80 Å. Ces microfilaments, sans organisation apparente, donnent l'image de fines granulations lorsque coupés transversalement. Par place on les trouve en contact avec les appendices du corps basal, notamment avec le pied basal, moins fréquemment avec la racine (Fig. 6 & 7).

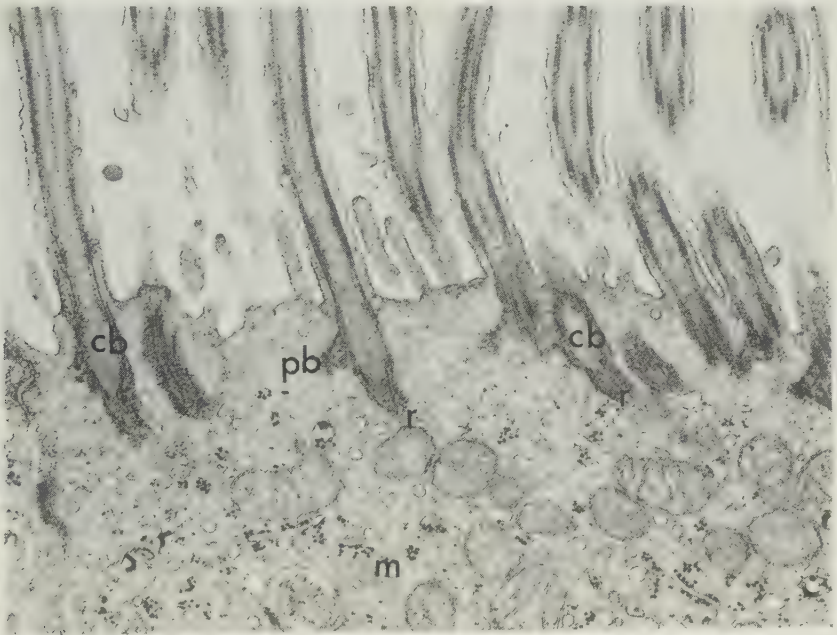


FIGURE 5

Portion apicale d'une cellule ciliée. Le cytoplasme apical est compris entre la membrane protoplasmique et l'accumulation mitochondriale (m). Noter sur le corps basal (cb) la présence d'une racine (r) et d'un pied basal (pb) ($\times 31\,900$).

Après incubation avec la méromyosine lourde, ces microfilaments présentent l'aspect en "fer de lance" (arrow-head) typique de la fixation de cette protéine sur l'actine (Fig. 8) (22).

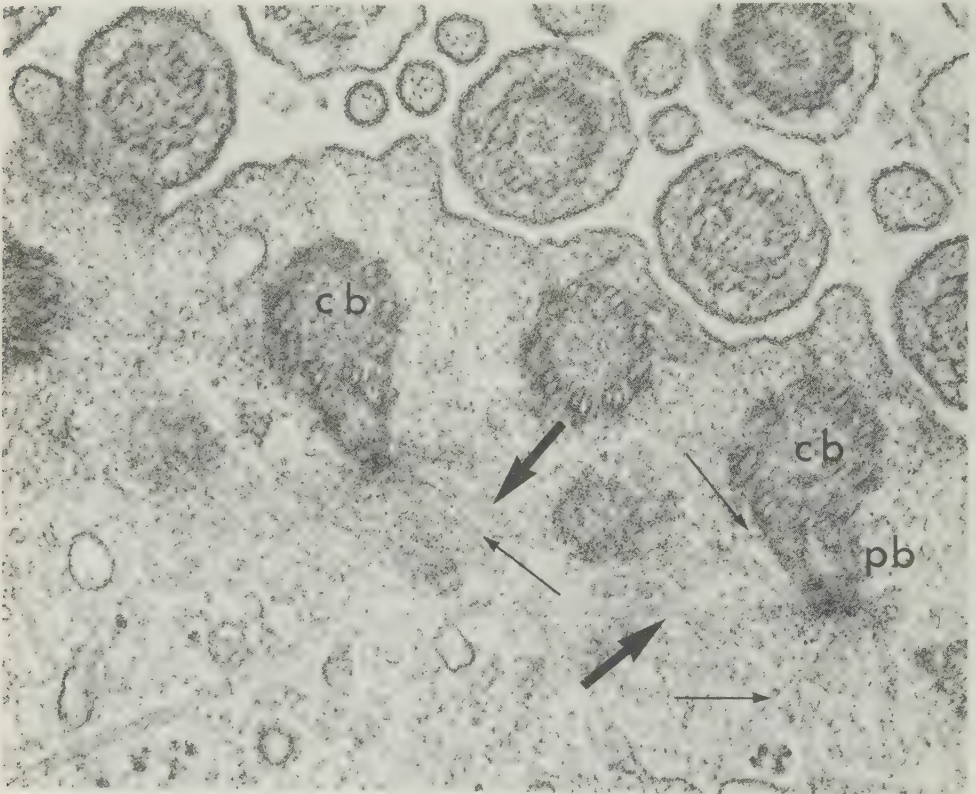


FIGURE 6

Microfilaments (flèches fines) et microtubules (flèches épaisses) en relation avec les pieds basaux (pb) de corps basaux (cb) coupés transversalement ($\times 87\,400$).

Dans ce cytoplasme apical on trouve également un grand nombre de microtubules, généralement disposés parallèlement à la surface aérienne, parfois plongeant entre les mitochondries de l'accumulation

supranucléaire. Certains microtubules semblent en étroite relation avec les pieds basaux (Fig. 6 & 7).

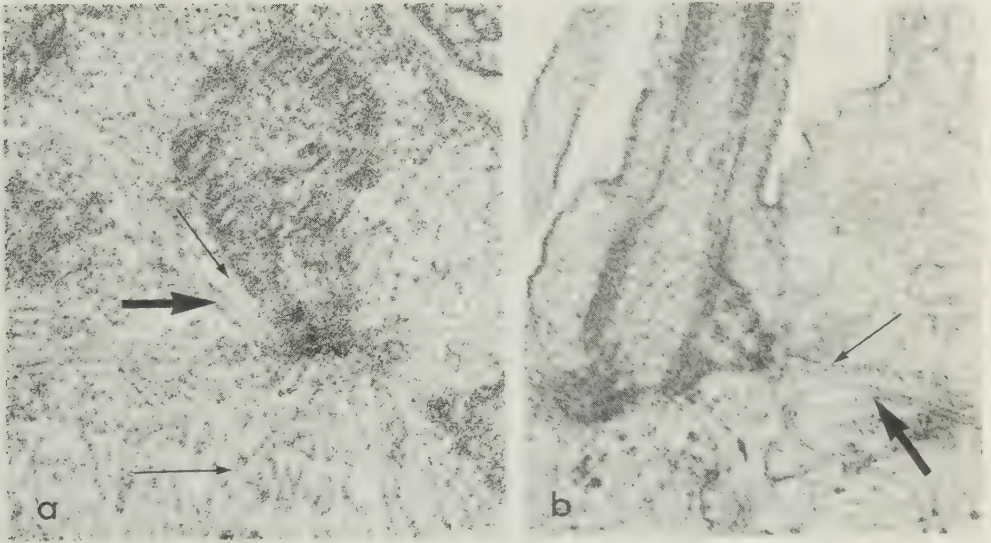


FIGURE 7

- a) Détail d'un corps basal de la figure 6 ($\times 127\,500$).
b) Coupe longitudinale d'un corps basal ($\times 84\,700$).
Microfilaments (flèches fines) et microtubules (flèches épaisses) en contact avec le pied basal.

Au-dessus de ce cytoplasme la surface de la cellule est recouverte de cils limités par une membrane en continuité avec la membrane protoplasmique, le contenu cellulaire étant un prolongement du cytoplasme cellulaire. A l'intérieur du cil on trouve le faisceau de microtubules en disposition "9 + 2" décrit plus haut. En coupe trans-

versale on remarque la présence sur les sous-fibres A de petits bras semblant en relation avec les sous-fibres B des paires voisines (Fig. 9).

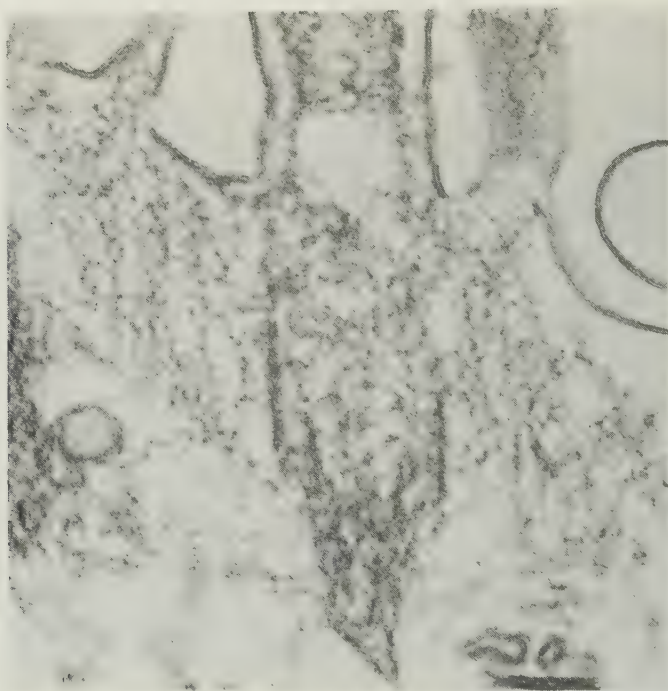


FIGURE 8

Aspect en "fer de lance" des microfilaments après incubation avec la méromyosine lourde ($\times 107\ 000$).

A la base du cil, baignant dans le cytoplasme apical, se trouve le corps ou corpuscule basal (basal body). Semblable à un centriole, il est de forme cylindrique et est constitué de neuf triplets microtubulaires, les deux microtubules internes de chaque triplet étant en continuité avec les microtubules périphériques du cil (Fig. 10). Sans paire centrale, il contient inconstamment une opacité homogène à

bords flous.

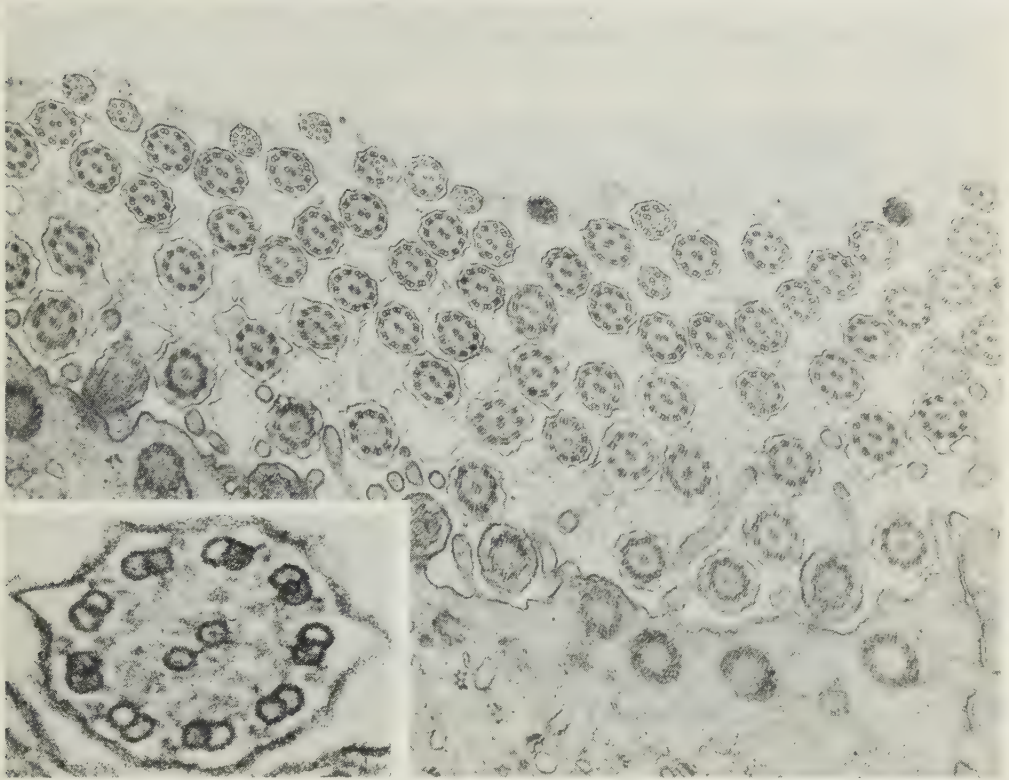


FIGURE 9

Portion apicale d'une cellule ciliée dont les cils sont coupés transversalement ($\times 35\,500$). Comparer le contenu ciliaire avec la figure 1 (médaillon $\times 188\,100$).

Le corps basal porte deux appendices : la racine (rootlet) et le pied basal (basal foot). La racine naît à la base du corps basal et prend la forme d'une virgule. Sur le flanc du corps basal opposé à la courbure de la racine se trouve le pied basal qui a la forme d'un

bouchon de champagne (Fig. 5). On constate que l'axe formé par le pied basal et la racine se trouve dans un plan perpendiculaire à celui passant par les microtubules centraux du cil.

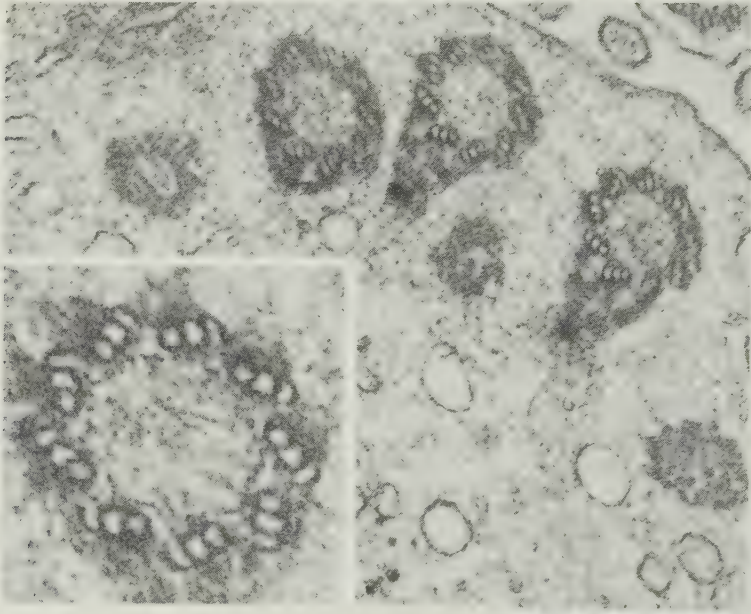


FIGURE 10

Corps basaux en coupe transversale ($\times 62\ 300$).

L'arrangement des microtubules en triplets est bien visible, la coupe passant dans un plan qui leur est perpendiculaire (ce qui n'est pas le cas dans les figures 6, 7 & 9) (médaillon $\times 161\ 300$).

DISCUSSION

Nos observations confirment les descriptions de la structure ciliaire (6, 8) et de l'épithélium cilié trachéo-bronchique de l'homme et du rat (1, 3).

De plus, elles montrent que le cytoplasme apical des cellules ciliées contient des microfilaments. Ces microfilaments sont abondants, contrairement aux "fines fibres" décrites dans les cellules ciliées de l'oviducte de souris et dans les trompes de Fallope humaines (6). Des filaments semblables morphologiquement, mais organisés en amas entre les corps basaux, ont été décrits dans la muqueuse respiratoire nasale de la souris (23). Enfin, leur localisation et leur structure les distinguent des tonofilaments décrits parfois comme reliant les corps basaux à la membrane cellulaire (24).

Notre étude par immunofluorescence démontre la présence d'actine sous forme d'une bande fluorescente homogène juste sous la surface cellulaire ciliée. Cette constatation, la morphologie des microfilaments et leur affinité pour la méromyosine indiquent qu'ils sont composés, en partie du moins, d'actine (17, 22, 25).

La présence de dynéine n'est pas démontrée biochimiquement dans les cils de l'épithélium trachéo-bronchique humain. On peut néanmoins penser par analogie à la structure des cils de protozoaires que les "bras" observés sur les microtubules de cet épithélium correspondent à des molécules de dynéine.

De par son implication dans les mouvements cellulaires, nous pensons que l'actine trouvée en relation avec les structures ciliaires basales joue un rôle dans le mouvement ciliaire et sa coordination. En effet, sans nier l'importance de la dynéine dans le mécanisme du mouvement du cil en tant qu'unité, la morphologie du corps basal, l'opposition entre le pied basal et la racine et enfin la relation étroite entre les microfilaments d'actine et ces structures sont très suggestives d'un système actif à la base du cil. La constatation que les cils battent dans le plan perpendiculaire à celui de la paire microtubulaire centrale (26) vient renforcer l'hypothèse d'un mécanisme basal. En effet, la paire centrale se trouve dans un plan perpendiculaire à l'axe "pied basal - racine" (27), c'est-à-dire que les cils battent dans le même plan que cet axe "pied basal - racine", donc dans une direction compatible avec une force liée au pied basal et/ou à la racine

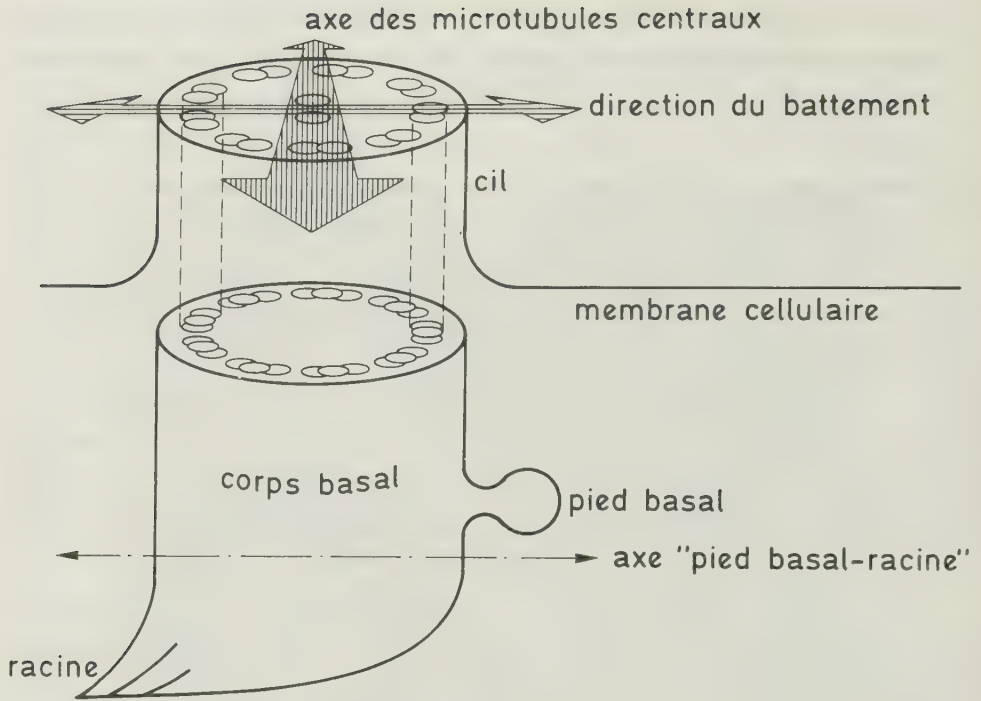


FIGURE 11

Schéma de la base d'un cil en coupe longitudinale.
Remarquer que la direction du battement ciliaire (perpendiculaire à l'axe des microtubules centraux) est dans le même plan que l'axe "pied basal - racine".

Nous concluons donc que les mouvements ciliaires et leur coordination sont, en partie du moins, le résultat d'un jeu de forces antagonistes à la base du cil; l'actine liée aux structures basales s'impose comme candidat à cette fonction.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) RHODIN J. and DALHAMN T. : Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z. Zellforsch.*, 44 : 345-412; 1956.
- 2) WATSON J. H. L. and BRINKMAN G. L. : Electron microscopy of the epithelial cells of normal and bronchitic human bronchus. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 90 : 851-866; 1964.
- 3) RHODIN J. : Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 93 : 1-15; 1966.
- 4) CUTZ E., CHAN W., WONG V. and CONEN P. E. : Ultrastructure and fluorescence histochemistry of endocrine (APUD-Type) cells in tracheal mucosa of human and various animal species. *Cell Tiss. Res.*, 158 : 425-437; 1975.
- 5) GREEN G. M. : In defense of the lung. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 102 : 691-703; 1970.
- 6) FAWCETT D. W. and PORTER K. R. : A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J. Morph.*, 94 : 221-264; 1954.
- 7) STEPHENS R. E. : Isolation of nexin - the linkage protein responsible for maintenance of the nine-fold configuration of flagellar axonemes. *Biol. Bull. (Woods Hole)* : 139 : 438; 1970.
- 8) AFZELIUS B. : Electron microscopy of the sperm tail. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 5 : 269-278; 1959.
- 9) GIBBONS I. R. : The structure and composition of cilia. *Symp. Int. Soc. Cell. Biol.*, 6 : 99-113; 1968.
- 10) GIBBONS I. R. : Chemical dissection of cilia. *Arch. Biol. (Liège)*, 76 : 317-352; 1965.
- 11) GIBBONS B. H. and GIBBONS I. R. : Flagellar movement and adenosine triphosphatase activity in sea urchin sperm extracted with Triton X-100. *J. Cell Biol.*, 54 : 75-97; 1972.
- 12) RENAUD F. L., ROWE A. J. and GIBBONS I. R. : Some properties of the protein forming the outer fibers of cilia. *J. Cell Biol.*, 36 : 79-90; 1968.

- 13) SUMMERS K. E. and GIBBONS I. R. : Effects of trypsin digestion on flagellar structures and their relationship to mobility. J. Cell Biol., 58 : 618-629; 1973.
- 14) WARNER F. D. and SATIR P. : The structural basis of ciliary bend formation. Radial spoke positional changes accompanying microtubule sliding. J. Cell Biol., 63 : 35-63; 1974.
- 15) SATIR P. : Studies on cilia. III. Further studies on the cilium tip and a "sliding filament" model of ciliary motility. J. Cell Biol., 39 : 77-94; 1968.
- 16) GOLDSTEIN S. F., HOLWILL M. E. J. and SILVESTER N. R. : The effects of laser microbeam irradiation on the flagellum of ciliidia (strigomonas) oncopelti. J. exp. Biol., 53 : 401-409; 1970.
- 17) POLLARD T. D. and WEIHING R. R. : Actin and myosin and cell movement. C.R.C. Crit. Rev. Biochem. GD Fassman, ed. Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio. 2 : 1-65; 1970.
- 18) ALLISON A. C. : The role of microfilaments and microtubules in cell movement, endocytosis and exocytosis. In "Locomotion of tissue cells" (Ciba Foundation Symposium, Excerpta Medica, Ass. Scient. Publishers, Amsterdam 1973) p. 109-143.
- 19) KAPINCI Y., ASSIMACOPOULOS A., IRLE C., ZWAHLEN A. and GABBIANI G. : Contractile interstitial cells in pulmonary alveolar septa : a possible regulator of ventilation/perfusion ratio ? J. Cell Biol., 60 : 375-392; 1974.
- 20) GABBIANI G., RYAN G. B., LAMELIN J.-P., VASSALLI P., MAJNO G., BOUVIER C. A., CRUCHAUD A. and LUSCHER E. F. : Human smooth muscle autoantibody. Amer. J. Path., 72 : 473-488; 1973.
- 21) ASSIMACOPOULOS A. and KAPINCI Y. : Lung fixation by perfusion - a simple method to control the pressure in the perfusion circuit. J. Microsc. (Oxford), 100 : 227-229; 1974.
- 22) ISHIKAWA H., BISCHOFF R. and HOLTZER H. : Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. J. Cell Biol., 43 : 312-328; 1969.
- 23) FRISCH D. and REITH E. J. : An interbasal body apparatus in mammalian cells. J. Ultrastruct. Res., 15 : 490-495; 1966.

- 24) CORDIER A. C. : Ultrastructure of the cilia of thymic cysts in "nude mice". Anat. Rec., 181 : 227-250; 1975.
- 25) GABBIANI G., CHAPONNIER C. and LUSCHER E. F. : Actin in the cytoplasm of andercortical cells. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 149 : 618-621; 1975.
- 26) GIBBONS I. R. : The relationship between the fine structure and direction of beat in gill cilia of a lamellibranch mollusc. J. biophys. biochem. Cytol., 11 : 179-205; 1961.
- 27) FLOCK A. and DUVALL A. J. : The ultrastructure of the kinocilium of the sensory cells in the inner ear and lateral line organs. J. Cell Biol., 25 : 1-8; 1965.

